

Die Wirkung verschiedener Ionen auf die katalytische Oxydation der Ascorbinsäure.

Von

L. Armentano.

(Aus der Medizinischen Klinik der kgl. ung. Horthy-Miklós-Universität in Szeged, Ungarn).

(Eingegangen am 4. Dezember 1940.)

Bevor es noch gelungen war, Vitamin C rein herzustellen, wußte man schon, daß dieses durch den Luftsauerstoff rasch angegriffen wird, wodurch es seine chemischen und biologischen Eigenschaften einbüßt. Über die Ursache dieser spontanen Oxydation der Ascorbinsäure gingen die Meinungen auseinander. Da die Oxydation in pflanzlichen Geweben bedeutend langsamer vor sich geht — Vitamin C hier also stabiler erscheint als in der wässrigen Lösung —, nahm man das Vorhandensein von Schutzstoffen in diesen Pflanzen an, durch die die rasche Oxydation des Vitamins C gehemmt werde. Nach einer anderen Ansicht wurde die stärkere Stabilität des Vitamins C einem Mangel an Oxydase in diesen Pflanzen zugeschrieben. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigten, daß es sich bei der spontanen Oxydation der Ascorbinsäure eigentlich um eine katalytische Oxydation handelt, bei der gewisse Schwermetallsalze die Hauptrolle spielen; insbesondere kommen dabei Cupri- und Ferri-Ionen in Betracht. *Hess* wies — noch vor der Darstellung von kristallisiertem Vitamin C — auf die Möglichkeit hin, daß die Schwermetallsalze bei der raschen Spaltung des Vitamins C eine Rolle spielen könnten. *Euler*, *Myrbäck* und *Larsson* bestimmten die Sauerstoff-Aufnahmefähigkeit des Vitamins C unter verschiedenen Bedingungen und fanden, daß diese durch Kupferionen stark gesteigert werde. *Kellie* und *Zilva* machten als erste darauf aufmerksam, daß Ascorbinsäure in vollkommen reinem destilliertem Wasser auch in Sauerstoffgegenwart nicht autoxydierbar sei. Wird Ascorbinsäure in dreimal destilliertem Wasser gelöst und in einem Quarzglas aufbewahrt, dann zeigt sie eine wesentlich verringerte Autoxydation, während die Einwirkung von 0,01 mg CuCl_2 oder FeCl_3 dieselbe bedeutend verstärkt. Zu demselben Ergebnis gelangten *Barron*, *Meio* und *Klemperer*. Sobald sie nämlich die Gegenwart von Kupferionen ausschließen konnten (*Warburg*-Röhrchen aus Pyrexglas, Lösungen in Gefäßen mit Paraffinverschluß usw.), kam es erst bei p_{H} -Werten über 7,6 zu einer Sauerstoffaufnahme durch die Ascorbinsäure. In Gegenwart von 0,00002 mg CuCl_2 kommt jedoch die Oxydation der

Ascorbinsäure auch im sauren Medium in Gang, und zwar in einer Geschwindigkeit, die im geraden Verhältnis zur Konzentration der Cupri-Ionen steht, wie aus der folgenden Versuchsreihe hervorgeht (s. Tabelle I). Die zur vollständigen Oxydation gleicher Ascorbinsäuremengen notwendige Zeit steht im geraden Verhältnis zur Menge der vorhandenen Kupferionen. Auf Grund dieser Versuchsergebnisse darf man demnach annehmen, daß das Kupfer bei der Oxydation des Vitamins C die Rolle eines Katalysators spielt. Dieser Vorgang verläuft nach *Barron*, *Meio* und *Klemperer* folgendermaßen:

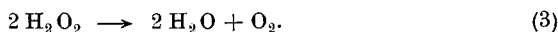
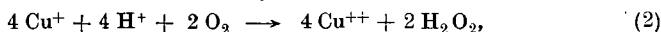
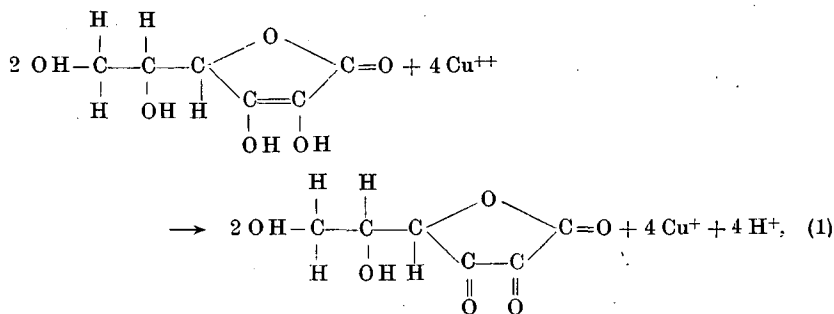


Tabelle I.

50 mg Ascorbinsäure in 50 ccm Aqua dest.				50 mg Ascorbinsäure in 50 ccm Aqua dest.			
Zeit	+ 0,25 ccm m/10 Cu Cl ₂ (5,36 mg)	+ 0,5 ccm m/10 Cu Cl ₂ (10,72 mg)	+ 1,0 ccm m/10 Cu Cl ₂ (21,44 mg)	Zeit	+ 0,25 ccm m/10 Cu Cl ₂ (5,36 mg)	+ 0,5 ccm m/10 Cu Cl ₂ (10,72 mg)	+ 1,0 ccm m/10 Cu Cl ₂ (21,44 mg)
	oxydierte Ascorbinsäuremenge				oxydierte Ascorbinsäuremenge		
5'	8,4 mg	11,3 mg	16,7 mg	55'	21,2 mg	27,5 mg	38,0 mg
10	10,7 „	12,5 „	17,4 „	75	22,3 „	30,0 „	40,5 „
15	11,6 „	13,5 „	22,0 „	2 h	—	—	50,0 „
25	13,5 „	19,6 „	23,5 „	3	—	50,0 „	—
35	17,8 „	22,7 „	25,8 „	4	50,0 „	—	—

Von vielen Seiten wurden Versuche ausgeführt, die die Verhinderung der katalytischen Oxydation der Ascorbinsäure zum Gegenstand hatten und den verschiedensten Stoffen wurde eine Hemmung der katalytischen Oxydation zugeschrieben, so von *Kellie* und *Zilva*: NaCN; *de Caro*: n/10 NaCl; *Bezssonoff*: HCN, CO, Eiweißverbindungen, gewissen Aminosäuren und Glutathion; *Giri*: Natriumpyrophosphat; *Leibowitz* und *Guggenheim*: KCNS und KJ; *Lyman*, *Schultze* und *King*: Metaphosphorsäure; *Wachholder*: Sulfosalicylsäure und Glutathion;

Klodt und *Stieb*: 0,5 bis 2,0 % NaCl und Rohrzucker. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird zweifellos durch einen großen Teil der aufgezählten Stoffe vermindert, die vollständige Verhinderung der Oxydation in den Geweben, im Harn usw. ist aber bisher noch niemals gelungen. Auch jene Verfahren, die den Zweck verfolgen, das Vitamin C mit Hilfe verschiedener Säuren bzw. durch niedrige p_H -Werte zu stabilisieren, erwiesen sich als bloß kurze Zeit wirksam.

Anläßlich von Versuchen, die die Durchströmung der Froschleber zum Gegenstand hatten, fiel uns auf, daß das Vitamin C in der Frosch-Ringerlösung verhältnismäßig lange stabil blieb, d. h. 4 bis 5 Stunden, während die Oxydation in einmal destilliertem Wasser sofort einsetzt; außerdem wurden in 24 Stunden bloß 24 bis 28 % der Ascorbinsäure oxydiert, in destilliertem Wasser hingegen 34 bis 46 %. Um zu klären, welches der in unserer Ringerlösung vorhandenen Salze eine Schutzwirkung ausübe, bereiteten wir von jedem der darin enthaltenen Salze je eine Lösung gleicher Konzentration und verglichen die in den einzelnen Salzlösungen ablaufende Oxydation der Ascorbinsäure mit der Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme in destilliertem Wasser. Es zeigte sich, daß die Oxydation in der NaCl-Lösung am langsamsten vor sich geht. Da jedoch NaCl in der Ringerlösung die stärkste Konzentration aufweist, wiederholten wir den Versuch noch mit folgenden Lösungen: m/10 KCl, CaCl₂, NaCl, NaHCO₃, ferner BaCl₂ und MgCl₂ (Tabelle II).

Tabelle II.

Zeit	100 mg Ascorbinsäure in 100 ccm m/10					
	K Cl	Ca Cl ₂	Na Cl	Ba Cl ₂	Mg Cl ₂	
	oxydierte Ascorbinsäuremenge					
30'	1,3 mg	1,7 mg	θ	0,4 mg	1,3 mg	6,2 mg
1 h	3,5 "	2,1 "	θ	0,9 "	3,1 "	6,7 "
2	5,0 "	3,5 "	θ	1,8 "	4,4 "	12,9 "
4	8,0 "	5,8 "	θ	5,7 "	6,8 "	14,4 "
15	30,0 "	18,3 "	4,4 mg	25,9 "	26,3 "	39,0 "
18	33,9 "	20,0 "	8,0 "	28,5 "	28,1 "	47,3 "
25	43,7 "	25,0 "	11,1 "	38,0 "	37,0 "	51,3 "

Auch hier übte NaCl die stärkste Schutzwirkung aus, doch ging auch in den KCl- und CaCl₂-Lösungen die Oxydation langsamer vor sich als im destillierten Wasser; in der der Ringerlösung entsprechenden Konzentration wurde allerdings die Oxydation durch die KCl-Lösung im Vergleich zu jener in destilliertem Wasser gesteigert. Die hier beschriebenen Erscheinungen weisen demnach darauf hin, daß Salzlösungen bei niedriger bzw. starker Konzentration ein jeweils anderes Verhalten zeigen und daß die katalytische Oxydation der Ascorbinsäure

durch die Salzkonzentration beeinflusst wird. Wir untersuchten weiter die Geschwindigkeit der Oxydation in NaCl-Lösungen verschiedener Konzentration.

Bei diesem Versuche wurden je 100 mg Ascorbinsäure in 300 bis 500 ccm fassenden Bechergläsern in je 100 ccm der m/10, m/5, m/2, m/1 und 2 m NaCl-Lösungen gelöst und die Reduktionsfähigkeit der Lösungen (je 2 ccm) zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Als Indikator diente n/100 Jod bzw. bei kleineren Ascorbinsäuremengen Dichlorphenolindophenol.

[Die zu den Versuchen verwendete Ascorbinsäure wurde uns in Pulverform („Vitaplex C“) durch die Firma „Chinoïn“-Budapest in zuvorkommender Weise zur Verfügung gestellt.]

Tabelle III.

Zeit	100 mg Ascorbinsäure in 100 ccm				
	m/10 NaCl	m/5 NaCl	m/2 NaCl	m/1 NaCl	2 m NaCl
	oxydierte Ascorbinsäuremenge				
1h	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
8	9,4 mg	3,1 mg	0	0	0
9	9,4 „	3,1 „	0	0	0
24	25,6 „	10,0 „	0	0	0
4 Tage	72,2 „	59,0 „	0	0	0
6 „	100,0 „	100,0 „	0	0	0

Obwohl die vollkommen offenen Gefäße an einem vor Licht ungeschützten Ort aufgestellt worden waren, kam es bei diesen Versuchen in den m/2-, m/1- und 2 m-NaCl-Lösungen in 24 Stunden zu keiner Änderung der Ascorbinsäurekonzentration (Tabelle III); in den m/10- und m/5-NaCl-Lösungen hingegen hatte die Oxydation schon in 6 bis 8 Stunden eingesetzt, in 4 Tagen waren 72,4 bzw. 59 % der ursprünglichen und in 6 Tagen die ganze Menge vollkommen oxydiert. In den m/2-, m/1- und 2 m-Lösungen hatte die Oxydation auch in 28 Tagen noch nicht begonnen (da die Gefäße offen standen, stieg infolge der Verdunstung die Konzentration der Lösung allmählich an, in demselben Maße nahm auch die Konzentration der Ascorbinsäure allmählich zu). *NaCl-Lösungen von der Konzentration m/2 oder noch mehr sind demnach imstande, die Ascorbinsäure vor der katalytischen Oxydation vollkommen zu schützen.* Um die Richtigkeit dieser Ergebnisse noch deutlicher zu beweisen, wiederholten wir diese Versuche, wobei den Lösungen noch CuCl_2 in verschiedenen Mengen beige mischt wurde. Es zeigte sich, daß m/1 NaCl auch die katalytische Wirkung von 0,05 bis 0,10 mg CuCl_2 abzuwehren imstande ist; die Wirkung von 5,4 mg Kupfer wird soweit abgeschwächt, daß 50 mg Ascorbinsäure in einer m/1-NaCl-Lösung erst in 24 bis

32 Stunden oxydiert wird, während dies in einmal destilliertem Wasser schon in 4 Stunden eintritt.

Um zu entscheiden, ob die hemmende Wirkung den Na- oder den Cl-Ionen zuzuschreiben sei, untersuchten wir ferner den Einfluß verschiedener Anionen auf die katalytische Oxydation in m/10-Lösung (Tabelle IV). In bezug auf unsere Frage kommen insbesondere Na_2SO_4 und NaNO_3 in Betracht; es zeigte sich, daß diese Verbindungen keine nennenswerte hemmende Wirkung ausüben. Die Beschleunigung der Oxydation durch Na_2HPO_4 und Na_2CO_3 bedarf keiner besonderen Erklärung; auffallenderweise wurde die Oxydation durch NaF stark beschleunigt.

Tabelle IV.

Zeit	100 mg Ascorbinsäure in 100 cem m/10						
	NaCl	NaNO_3	Na_2SO_4	NaF	Na_2HPO_4	Na_2CO_3	Einmal dest. Wasser
	oxydierte Ascorbinsäuremenge						
1,0 h	θ	0,9 mg	3,5 mg	3,5 mg	4,0 mg	1,3 mg	2,6 mg
1,5	θ	5,3 "	6,2 "	7,6 "	8,0 "	5,5 "	5,8 "
2,5	0,4 mg	8,0 "	8,9 "	9,8 "	11,6 "	7,1 "	7,5 "
6,5	7,5 "	14,3 "	18,7 "	22,3 "	19,1 "	16,5 "	16,0 "
7,5	8,9 "	22,3 "	23,6 "	29,4 "	24,5 "	23,2 "	20,9 "
24,0	33,9 "	44,4 "	50,4 "	70,0 "	47,8 "	59,3 "	44,8 "

Die Oxydation der Ascorbinsäure wird demnach nicht durch die Na-, sondern durch die Cl-Ionen gehemmt, wie auch die mit m/l CaCl_2 , m/l KCl und m/l NaCl ausgeführten Versuche beweisen. In dieser Konzentration wird nämlich die katalytische Oxydation auch durch CaCl_2 bzw. KCl gehemmt (Tabelle V). Wurde die Ascorbinsäure in

Tabelle V.

Zeit	100 mg Ascorbinsäure in 100 ccm				Zeit	100 mg Ascorbinsäure in 100 ccm			
	m/l Ca Cl ₂ *	m/l Na Cl *	m/l K Cl *	Aqua dest.		m/l Ca Cl ₂ *	m/l Na Cl *	m/l K Cl *	Aqua dest.
	oxydierte Ascorbinsäuremenge					oxydierte Ascorbinsäuremenge			
1 h	θ	θ	θ	2,6 mg	9 h	θ	θ	θ	23,0 mg
2	θ	θ	θ	5,8 „	1 Tag	θ	θ	θ	44,8 „
3	θ	θ	θ	9,0 „	4 Tage	θ	θ	θ	100,0 „
7	θ	θ	θ	16,0 „	7 „	θ	θ	θ	—

* Zusatz von 0,05 bis 0,1 mg CuCl_2 führte zu denselben Ergebnissen.

einer dieser Lösungen gelöst, dann war auch in offenen Gefäßen keine Verminderung der Ascorbinsäurekonzentration zu beobachten; CaCl_2 erwies sich sogar der katalytischen Wirkung von 0,25 cem m/10 CuCl_2 gegenüber als aktiver als z. B. NaCl (Tabelle VI).

Tabelle VI.

50 mg Ascorbinsäure in 50 ccm					50 mg Ascorbinsäure in 50 ccm				
Zeit	Aqua dest.	m/l Na Cl	m/l Ca Cl ₂	m/l K Cl	Zeit	Aqua dest.	m/l Na Cl	m/l Ca Cl ₂	m/l K Cl
	+ 0,25 ccm m/10 Cu Cl ₂					+ 0,25 ccm m/10 Cu Cl ₂			
	oxydierte Ascorbinsäuremenge					oxydierte Ascorbinsäuremenge			
15'	8,4 mg	θ	θ	θ	4 h	50,0 mg	—	—	—
30	17,0 „	1,2 mg	1,2 mg	1,8 mg	16	—	28,1 mg	23,7 mg	38,0 mg
1 h	22,0 „	1,2 „	1,5 „	1,8 „	24	—	42,5 „	36,0 „	49,1 „
2	40,1 „	2,4 „	1,5 „	4,2 „					

Nach *Bezssonoff* ist der Oxydationsgrad der Ascorbinsäure der Anfangskonzentration verkehrt proportional, was mit den durch diesen Forscher in frischen Lösungen ausgeführten Potentialbestimmungen im Einklang steht. Dies besagt, daß Vitamin C in geringen Mengen bedeutend leichter oxydierbar ist als in konzentrierten Lösungen. Da wir die erwähnten Versuche unter Verwendung einer 0,1 %igen Ascorbinsäurelösung ausgeführt hatten, erschien es notwendig zu prüfen, ob die hemmende Wirkung von m/l NaCl, KCl und CaCl₂ auch bei Lösungen geringerer Konzentration zu finden sei: Da auch bei der 0,01 %igen Ascorbinsäurelösung tagelang kein Verlust nachweisbar war, muß angenommen werden, daß die hemmende Wirkung der genannten Lösungen von der Konzentration der Ascorbinsäure unabhängig ist.

Es fragt sich nun noch, wie die erwähnten Salzlösungen ihre Wirkung ausüben.

Bekanntlich zerlegte *Brönsted* die in der chemischen Kinetik gebrauchte Konstante „ k “ in drei Faktoren: $k = k_r k_m F$, wobei k_r die für die Reaktion charakteristische, aber vom Medium unabhängige, k_m die für das Medium charakteristische, aber von der Reaktion unabhängige Konstante und F den kinetischen Aktivitätsfaktor darstellt. Bei der durch die Neutralsalze auf die Geschwindigkeitskonstante ausgeübten Wirkung kann es sich um eine Mediumwirkung, eine kinetische Salzwirkung und um Katalyse handeln (*A. Kiss*). Die kinetische Salzwirkung ist primär oder sekundär. Die primäre Salzwirkung hängt mit dem veränderlichen Faktor F zusammen; die sekundäre kinetische Salzwirkung besteht darin, daß die Konzentration der wirksamen Stoffe durch die Neutralsalze infolge der Verschiebung des chemischen Gleichgewichts verändert wird. Unter Katalyse hat man in diesem Falle jene Erscheinungen zu verstehen, bei denen die Neutralsalze nicht durch die Änderung der aufgezählten Faktoren, sondern auf andere Weise zur Wirkung gelangen. Auf welche Art die neutralen Salze hier ihre Wirkung ausüben, ist schwer festzustellen, da es sich um konzentrierte Salzlösungen handelt, bei denen bekanntlich viel verwickeltere Verhältnisse vorliegen als in verdünnten. In letzterem Falle darf man nämlich annehmen, daß das Medium durch geringe Mengen von Neutralsalzen nicht in dem Maße beeinflußt werde, daß dadurch k_m eine Veränderung erleidet; auf diese Weise bleibt dann auch die Reihe $k_r k_m = k_o$ unverändert. Bei konzentrierten Salzlösungen hat man in erster Linie mit

der Mediumwirkung sowie mit der primären kinetischen Salzwirkung zu rechnen, fast immer spielt jedoch auch die sekundäre Salzwirkung eine Rolle, wodurch die Bestimmung der Werte erschwert wird. Daneben bietet der elektrostatische Raum des Mediums reichlich Gelegenheit zur physikalischen Katalyse. Wenn man auch von der letzteren und der sekundären kinetischen Salzwirkung absieht, bleibt noch die primäre kinetische Salzwirkung und die des Mediums, deren experimentelle Trennung einstweilen ein noch unlösbares Problem darstellt. Bei wässrigen verdünnten Lösungen läßt sich die primäre Salzwirkung auf Grund der *Brönstedtschen* Theorie — unter Beachtung der durch die spezifische Ionenwirkung bedingten Ungenauigkeit — berechnen, während dies bei konzentrierten Salzlösungen nicht gelingt. Bei konzentrierten Salzlösungen ist der Aktivitätsfaktor der einzelnen Ionen so starken Änderungen unterworfen, daß man dies nicht in einem theoretischen Ausdruck zusammenfassen kann. Nimmt man aber trotzdem an, daß der kinetische Aktivitätsfaktor bei jeder Konzentration zur genauen Berechnung der kinetischen Salzwirkung zu verwenden sei, dann wäre zu erwarten, daß die kinetische Salzwirkung bei verdünnten Lösungen im Vergleich zu den konzentrierten jeweils mit dem entgegengesetzten Zeichen versehen sei. Bei Reaktionen, die + Salzwirkung aufweisen, würde daher der Beschleunigung in verdünnten Lösungen eine Verzögerung in konzentrierten Salzlösungen entsprechen, während bei den Reaktionen mit — Salzwirkung das Gegenteil der Fall wäre. Dies ist auf den Umstand zurückzuführen, daß sich die Aktivitätsfaktoren der Ionen in verdünnten Lösungen anders verhalten als in konzentrierten. Bei verdünnten Lösungen nimmt der Wert der Aktivitätsfaktoren zu, bei konzentrierten Lösungen ab. Über die Stärke und das Zeichen der Wirkung des Mediums läßt sich auch theoretisch nichts Näheres sagen.

Aus dem hier Gesagten geht hervor, daß wir die Versuchsergebnisse richtig einschätzten. Die erwähnten Erscheinungen sind als Wirkung der Neutralsalze auf die zwischen Ascorbinsäure und Sauerstoff ablaufende Reaktion aufzufassen. Da sich diese Wirkung je nach dem Grade der Konzentration ändert, bei geringer Konzentration hat man es mit +, bei starker mit — Salzwirkung zu tun, glauben wir annehmen zu dürfen, daß es sich in diesem Falle um eine *kinetische Salzwirkung* handle. Aus unserer Beschreibung erhellen die Schwierigkeiten, mit denen die Klärung der oben gestellten Frage verbunden ist, es ist jedoch zu erwarten, daß man mit Hilfe genauer kinetischer Untersuchungen schließlich auch dieses Problem lösen wird.

Die Kenntnis der Wirkung der Neutralsalze auf die katalytische Oxydation des Vitamins C führt zu einer Reihe anderer theoretischer und praktischer Fragen: die Rolle der Neutralsalze im Blute bzw. im Harn, ihre Wirkung auf die Oxydase u. dgl. m. Auf diese Fragen wollen wir an anderer Stelle eingehen.

Zusammenfassung.

Die Oxydation der Ascorbinsäure wird durch Cupri-Ionen katalysiert, zu deren Menge die Geschwindigkeit in geradem Verhältnis steht.

Die katalytische Oxydation der Ascorbinsäure wird durch verschiedene Ionen auf verschiedene Weise beeinflusst. Die Wirkung der Neutralsalze hängt von der Konzentration ihrer Lösung ab, KCl, NaCl und CaCl_2 beschleunigen die Oxydation in verdünnten, hemmen jedoch dieselbe in starken Lösungen. Diese Hemmung kann Grade erreichen, bei denen die *Spontanoxydation der Ascorbinsäure vollkommen verhindert wird*; durch die genannten Salzlösungen wird sogar die katalysierende Wirkung von 0,05 bis 0,1 mg CuCl_2 abgewehrt. Reihenversuche führten zu dem Ergebnis, daß diese Wirkung durch die Cl-Ionen bedingt sei. Da der positiven Salzwirkung in verdünnten Lösungen eine negative (hemmende) Wirkung in konzentrierten Lösungen entspricht, ist die Erscheinung offenbar als primäre kinetische Salzwirkung aufzufassen.

Literatur.

Barron, Meio u. Klemperer, J. of biol. Chem. 112, 625, 1936; 116, 563, 1936. — Bezssonoff u. Wolosyn, C. r. Soc. Biol. Paris 125, 884, 1937. — de Caro u. Giani, Zeitschr. f. physiol. Chem. 228, 13, 1934. — Euler, Myrbäck u. Larsson, ebenda 217, 1, 1933. — Giri, zit. nach Klodt u. Stieb. — Hess, Boston Med. Surg. J. 187, 101, 1922. — Kellie u. Zilva, Biochem. J. 29, 1028, 1935. — Klodt u. Stieb, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 188, 21, 1937; 190, 341, 1938. — A. Kiss, M. chem. folyóirat (ung.) 37, é. f. 121, 1931. — Derselbe, Acta Chem. Min. et Phys. Tom. 1, H. 3, 1929. — Leibowitz u. Guggenheim, Zeitschr. f. Vitaminforsch. 8, 1, 1938. — Lyman, Schultze u. King, J. of biol. Chem. 118, 757, 1937. — Wachholder u. Okrent, diese Zeitschr. 306, 6, 1940.
